

PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty.

RECORD COPY

Receiving Office use only	
PCT/NL 99 / 00518	
International Application No.	
16 AUG 1999	16.08.99
International Filing Date	
BUREAU VOOR DE INDUSTRIËLE EIGENDOM P.C.T. INTERNATIONAL APPLICATION	
Name of receiving Office and "PCT International Application"	
Applicant's or agent's file reference (if desired) (12 characters maximum) WO 800110-AI	

Box No. I TITLE OF INVENTION	
Method of detecting a DNA sequence, a DNA sequence, a method of making a DNA construct and the use thereof	
Box No. II APPLICANT	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)	
Stichting voor de Technische Wetenschappen Raadstede 15/19 NL-3431 HA NIEUWEGEIN the Netherlands	
<input type="checkbox"/> This person is also inventor.	
Telephone No. (31) 30 600 12 11	
Facsimile No. (31) 30 601 44 08	
Teleprinter No.	
State (that is, country) of nationality: NL	State (that is, country) of residence NL
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input checked="" type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box	
Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)	
OTTE, Arie Pieter Apkenstraat 37 NL-1447 PN PURMEREND the Netherlands	
This person is: <input type="checkbox"/> applicant only <input checked="" type="checkbox"/> applicant and inventor <input type="checkbox"/> inventor only (If this check-box is marked, do not fill in below.)	
State (that is, country) of nationality: NL	State (that is, country) of residence: NL
This person is applicant for the purposes of: <input type="checkbox"/> all designated States <input type="checkbox"/> all designated States except the United States of America <input checked="" type="checkbox"/> the United States of America only <input type="checkbox"/> the States indicated in the Supplemental Box	
<input type="checkbox"/> Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet.	
Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE	
The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as: <input checked="" type="checkbox"/> agent <input type="checkbox"/> common representative	
Name and address: (Family name followed by given name; for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country.)	
ALTENBURG, Bernardus Stephanus Franciscus et al. OCTROOIBUREAU LOS EN STIGTER B.V. Weteringschans 96 NL-1017 XS AMSTERDAM the Netherlands	
Telephone No. (31) 20 623 68 32	
Facsimile No. (31) 20 626 00 07	
Teleprinter No.	
<input type="checkbox"/> Address for correspondence: Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent.	

Box No. V DESIGNATION STATES

The following designations are to be made under Rule 4.9(a) (mark the applicable check-boxes; at least one must be marked):

Regional Patent

- ☒ **AP** ARIPO Patent: GH Ghana, GM Gambia, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, UG Uganda, ZW Zimbabwe, and any other State which is a Contracting State of the Harare Protocol and of the PCT
- ☒ **EA** Eurasian Patent: AM Armenia, AZ Azerbaijan, BY Belarus, KG Kyrgyzstan, KZ Kazakhstan, MD Republic of Moldova, RU Russian Federation, TJ Tajikistan, TM Turkmenistan, and any other State which is a Contracting State of the Eurasian Patent Convention and of the PCT
- ☒ **EP** European Patent: AT Austria, BE Belgium, CH and LI Switzerland and Liechtenstein, CY Cyprus, DE Germany, DK Denmark, ES Spain, FI Finland, FR France, GB United Kingdom, GR Greece, IE Ireland, IT Italy, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Netherlands, PT Portugal, SE Sweden, and any other State which is a Contracting State of the European Patent Convention and of the PCT
- ☒ **OA** OAPI Patent: BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Central African Republic, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroon, GA Gabon, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauritania, NE Niger, SN Senegal, TD Chad, TG Togo, and any other State which is a member State of OAPI and a Contracting State of the PCT (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line)

National Patent (if other kind of protection or treatment desired, specify on dotted line):

- | | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> AE United Arab Emirates | <input checked="" type="checkbox"/> LR Liberia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AL Albania | <input checked="" type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input checked="" type="checkbox"/> AM Armenia | <input checked="" type="checkbox"/> LT Lithuania |
| <input checked="" type="checkbox"/> AT Austria | <input checked="" type="checkbox"/> LU Luxembourg |
| <input checked="" type="checkbox"/> AU Australia | <input checked="" type="checkbox"/> LV Latvia |
| <input checked="" type="checkbox"/> AZ Azerbaijan | <input checked="" type="checkbox"/> MD Republic of Moldova |
| <input checked="" type="checkbox"/> BA Bosnia and Herzegovina | <input checked="" type="checkbox"/> MG Madagascar |
| <input checked="" type="checkbox"/> BB Barbados | <input checked="" type="checkbox"/> MK The former Yugoslav Republic of Macedonia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BG Bulgaria | |
| <input checked="" type="checkbox"/> BR Brazil | <input checked="" type="checkbox"/> MN Mongolia |
| <input checked="" type="checkbox"/> BY Belarus | <input checked="" type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input checked="" type="checkbox"/> CA Canada | <input checked="" type="checkbox"/> MX Mexico |
| <input checked="" type="checkbox"/> CH and LI Switzerland and Liechtenstein | <input checked="" type="checkbox"/> NO Norway |
| <input checked="" type="checkbox"/> CN China | <input checked="" type="checkbox"/> NZ New Zealand |
| <input checked="" type="checkbox"/> CU Cuba | <input checked="" type="checkbox"/> PL Poland |
| <input checked="" type="checkbox"/> CZ Czech Republic | <input checked="" type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input checked="" type="checkbox"/> DE Germany | <input checked="" type="checkbox"/> RO Romania |
| <input checked="" type="checkbox"/> DK Denmark | <input checked="" type="checkbox"/> RU Russian Federation |
| <input checked="" type="checkbox"/> EE Estonia | <input checked="" type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input checked="" type="checkbox"/> ES Spain | <input checked="" type="checkbox"/> SE Sweden |
| <input checked="" type="checkbox"/> FI Finland | <input checked="" type="checkbox"/> SG Singapore |
| <input checked="" type="checkbox"/> GB United Kingdom | <input checked="" type="checkbox"/> SI Slovenia |
| <input checked="" type="checkbox"/> GD Grenada | <input checked="" type="checkbox"/> SK Slovakia |
| <input checked="" type="checkbox"/> GE Georgia | <input checked="" type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input checked="" type="checkbox"/> GH Ghana | <input checked="" type="checkbox"/> TJ Tajikistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> GM Gambia | <input checked="" type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> HR Croatia | <input checked="" type="checkbox"/> TR Turkey |
| <input checked="" type="checkbox"/> HU Hungary | <input checked="" type="checkbox"/> TT Trinidad and Tobago |
| <input checked="" type="checkbox"/> ID Indonesia | <input checked="" type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input checked="" type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input checked="" type="checkbox"/> IN India | <input checked="" type="checkbox"/> US United States of America |
| <input checked="" type="checkbox"/> IS Iceland | |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input checked="" type="checkbox"/> UZ Uzbekistan |
| <input checked="" type="checkbox"/> KE Kenya | <input checked="" type="checkbox"/> VN Viet Nam |
| <input checked="" type="checkbox"/> KG Kyrgyzstan | <input checked="" type="checkbox"/> YU Yugoslavia |
| <input checked="" type="checkbox"/> KP Democratic People's Republic of Korea | <input checked="" type="checkbox"/> ZA South Africa |
| | <input checked="" type="checkbox"/> ZW Zimbabwe |
| <input checked="" type="checkbox"/> KR Republic of Korea | Check-boxes reserved for designating States which have become party to the PCT after issuance of this sheet: |
| <input checked="" type="checkbox"/> KZ Kazakhstan | <input type="checkbox"/> |
| <input checked="" type="checkbox"/> LC Saint Lucia | <input type="checkbox"/> |
| <input checked="" type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |

Precautionary Designation Statement: In addition to the designations made above, the applicant also makes under Rule 4.9(b) all other designations which would be permitted under the PCT except any designation(s) indicated in the Supplemental Box as being excluded from the scope of this statement. The applicant declares that those additional designations are subject to confirmation and that any designation which is not confirmed before the expiration of 15 months from the priority date is to be regarded as withdrawn by the applicant at the expiration of that time limit. (Confirmation of a designation consists of the filing of a notice specifying that designation and the payment of the designation and confirmation fees. Confirmation must reach the receiving Office within the 15-month time limit.)

Werkwijze voor het detecteren van een DNA-volgorde, een DNA-volgorde, een werkwijze voor het maken van een DNA-construct en toepassing daarvan

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het detecteren, en optioneel selecteren, van een DNA-volgorde.

Het is lastig een specifieke DNA-volgorde te detecteren waarvan de nucleotidevolgorde niet bekend is. Ofschoon genetische manipulatie reeds sinds tientallen jaren wordt toegepast, is het voorspelbaar tot expressie brengen van een gen in een genetisch gemanipuleerde plant, dier of ander eukaryoot organisme een probleem. Ofschoon bij veel microbiologische productiewijzen slechts wordt gestreefd naar een zo hoog mogelijke expressie, is voor veel toepassingen bij planten of dieren de precieze mate waarin een gen tot expressie komt van groot belang. Zowel te veel expressie als te weinig expressie kunnen ertoe leiden dat het gewenste resultaat niet wordt bereikt. Ook blijkt in de praktijk dat na geslachtelijke voortplanting het vermogen tot expressie in een latere generatie vaak weer verloren gaat. Verder is het ook moeilijk het tijdstip van expressie en de plaats in het organisme (weefsel-specificiteit) te controleren.

De onderhavige uitvinding beoogt een werkwijze van de in de aanhef genoemde soort te verschaffen welke het mogelijk maakt een DNA-volgorde selecteren en desgewenst te isoleren waarmee de bovengenoemde problemen kunnen worden vermeden.

Daartoe wordt de werkwijze volgens de aanhef gekenmerkt doordat de te detecteren DNA-volgorde een stabiele expressie-bevorderende eigenschap heeft, welke werkwijze de stappen omvat van

- 1) het in een vector cloneren van DNA-fragmenten met een grootte <5000 baseparen tussen i) een DNA-volgorde welke betrokken is bij de inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chromatine, en ii) een reporter-gen dat een promotor omvat, onder oplevering van een verscheidenheid van een fragment bevattende vectoren waarbij de afstand

tussen de DNA-volgorde welke betrokken is bij de inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chromatine en het reporter-gen minder dan 5000 baseparen is;

2) het in gastheercellen brengen van de vectoren, in welke gastheercellen de promotor actief kan zijn doch inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chromatine in de vectoren tot onderdrukking van de transcriptie van het reporter-gen leidt; en

3) het aan een selectie onderwerpen van de gastheercellen om een gastheercel die activiteit van het reporter-gen vertoont te identificeren.

Aldus wordt een betrouwbare werkwijze verschaft voor het detecteren van DNA-volgorden met een stabiele expressie-bevorderende eigenschap. Deze volgorde kan desgewenst worden geïsoleerd en voor een ander gen worden geïnserteerd. Als DNA in stap 1 wordt bijvoorbeeld met een restrictie-enzym geknipt DNA van een eukaryoot organisme, in het bijzonder een plant of gewerveld dier, gebruikt, waarbij de DNA-fragmenten een grootte hebben van minder dan 5000 baseparen.

Hierbij zal het duidelijk zijn dat in het voorkomen-de geval op eenvoudige wijze onderscheid kan worden gemaakt tussen enerzijds een expressie-verhogende volgorde ("enhancer"), die het transcriptie onderdrukkende effect van chromatine in extreme gevallen zou kunnen neutraliseren, en anderzijds het stabiele expressie-bevorderende DNA-fragment. In het eerste geval wordt het reporter-gen in een organisme getransformeerd met een vector die de enhancer tezamen met het reporter-gen bevat maar zonder de transcriptie onderdrukkende volgorde in hogere mate tot expressie gebracht dan in een organisme getransformeerd met een vector die een stabiele expressie-bevorderend DNA-fragment tezamen met het reporter-gen bevat en eveneens zonder de transcriptie onderdrukkende volgorde.

Volgens een eerste voorkeursuitvoering geschiedt het selecteren in stap 3) onder gebruikmaking van een reporter-gen dat resistentie verschaft tegen een groeiremmend agens en worden de gastheercellen gekweekt in aanwezigheid van het groeiremmende agens.

Hierdoor wordt de groei van gastheercellen die zonder een actief resistentie-verlenend gen niet resistent zijn tegen het groeiremmende agens geremd en kunnen die gastheercellen welke een stabiele expressie-bevorderende DNA-volgorde bezitten worden geselecteerd.

Bij voorkeur is het groeiremmende agens aanwezig in een concentratie die zo hoog is dat gastheercellen waarin het gen dat resistentie verschaft tegen het groeiremmende agens niet actief is worden gedood.

10 Aldus wordt in hoge mate verzekerd dat groeiende organismen een vector bevatten met de gewenste DNA-volgorde.

Zeer geschikt wordt als het groeiremmende agens een antibioticum toegepast en is het reporter-gen een resistentie tegen het antibioticum verlenend gen.

15 Er is een grote verscheidenheid aan resistentie tegen antibioticum verlenende genen in het vak beschikbaar, waardoor eenvoudig een voor de gastheercel geschikt gen kan worden gekozen. Daarbij wordt een gen gekozen dat resistentie verschaft tegen een groeiremmend agens waar de gastheercel
20 niet van nature al resistent tegen is.

Volgens een tweede uitvoeringsvorm codeert het reporter-gen voor *Green Fluorescent Protein*.

Dit maakt het mogelijk door fluorescentiemeting gastheercellen met de gewenste DNA-bevattende vector te detecteren en te isoleren.

Volgens een voorkeursuitvoering worden fluorescente gastheercellen van niet-fluorescente gastheercellen gescheiden met behulp van een *Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS)*.

30 Volgens een derde uitvoeringsvorm is het reporter-gen luciferase. Met luciferase kan de expressie in een (semi)kwantitatieve wijze worden gemeten.

Bij voorkeur hebben in stap 1) de fragmenten in hoofdzaak een grootte tussen 2000 - 3000 base-paren.

35 Fragmenten van een dergelijke grootte maken het mogelijk de te detecteren volgorde nauwkeuriger te lokaliseren zonder dat het aantal in stap 3) na te lopen gastheercellen zo groot wordt dat dit een onnodige werkbelasting gaat vormen.

De DNA-volgorde die betrokken is bij de inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chromatine is geschikt een DNA-volgorde die door een heterochromatine-bindend eiwitcomplex dat HP1 (heterochromatine-bindend eiwit 1) omvat wordt herkend en het HP1-omvattende complex in de gastheercel tot expressie wordt gebracht. Volgens een alternatieve werkwijze wordt de DNA-volgorde herkend door een complex dat een Polycombgroep (PcG) eiwit omvat, en wordt het Polycomb groepeiwit-omvattende complex in de gastheercel tot expressie gebracht. Volgens weer een andere uitvoeringsvorm wordt de DNA-volgorde herkend door een complex dat een histon-deacetylase-activiteit bezit, en wordt het histon-deacetylase-activiteit bezittende complex in de gastheercel tot expressie gebracht. Tenslotte is volgens een verdere uitvoeringsvorm de DNA-volgorde die betrokken is bij de inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chromatine, een DNA-volgorde die door een eiwitcomplex dat MeCP2 (methyl-CpG-bindend eiwit 2) omvat wordt herkend, en wordt het MeCP2-omvattende complex in de gastheercel tot expressie gebracht.

Aldus worden vier geschikte DNA-volgorde herkende complexen verschaft, waarbij wordt opgemerkt dat in het geval het complex niet in de gastheercel tot expressie komt, dit geen vals positieven oplevert en slechts een beperking betekent van de doelmatigheid waarmee de gezochte DNA-volgorden kunnen worden opgespoord.

Geschikt omvat het eiwitcomplex een fusie-eiwit, zoals een eiwitcomplex waarbij het eerste deel een de DNA-bindingsplaats van Lex A- of GAL4-DNA-bindend deel is.

Dergelijke geschikte DNA-bindingsplaatsen zijn in het vak bekend en zijn afkomstig uit bacteriën respectievelijk gist.

Bij voorkeur is het organisme in stap 1) gekozen uit de groep bestaande uit een plant en een gewerveld dier, zoals in het bijzonder een zoogdier.

Voor deze organismen geldt dat mede door de grote hoeveelheid chromosomaal DNA, zonder de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding, het vinden van de te detecteren DNA-volgorde in wezen niet mogelijk is nu de basevolgorde daarvan immers onbekend is.

Volgens een verdere voorkeursuitvoering is de vector een episomaal replicerende vector, zoals geschikt een vector die een replicatie-oorsprong van het Epstein-Barr Virus (EBV), OriP, en een nucleair antigeen (EBNA-1) omvat.

5 Dergelijke vectoren vormen gemakkelijk te hanteren, genetisch te manipuleren en chromatinestructuur waarin de expressie wordt onderdrukt vormende vectoren.

De uitvinding heeft verder betrekking op een DNA-volgorde gekozen uit i) een DNA-volgorde geïsoleerd uit een
10 plant of gewerveld dier; of afgeleiden daarvan, en ii) een synthetische of door middel van genetische manipulatie geconstrueerde DNA-volgorde, welke DNA-volgorde een repressie-remmende volgorde is welke met de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding kan worden gedetecteerd, geselecteerd en op-
15 tioneel gecloneerd.

Meer specifiek heeft de uitvinding verder betrekking op een DNA-volgorde gekozen uit i) een DNA-volgorde geïsoleerd uit een plant of gewerveld dier; of afgeleiden daarvan, en ii) een synthetische of door middel van genetische
20 manipulatie geconstrueerde DNA-volgorde, welke DNA-volgorde met de werkwijze volgens de onderhavige uitvinding is gedetecteerd, geselecteerd en optioneel gecloneerd.

De DNA-volgorden volgens de uitvinding onderscheiden zich van de bekende DNA-volgorden doordat zij geen *enhancers*
25 of *silencers* zijn.

Synthetische DNA-volgorden kunnen volgens in het vak algemeen bekende technieken worden bereid. In het bijzonder kunnen grote aantallen verschillende DNA-volgorden worden vervaardigd, en dergelijke volgorden zijn commercieel ver-
30 krijgbaar (bijvoorbeeld bij: Pharmacia Biotech, Uppsala, Zweden). Dergelijke synthetische DNA-volgorden moeten wel zijn ingericht voor het kloneren in een plasmide. Dit is in het vak algemeen bekend en geschiedt bijvoorbeeld met een restrictie knipplaats bevattende *linkers*.

35 Het zal duidelijk zijn dat de onderhavige uitvinding tevens gericht is op een werkwijze voor het maken van een DNA-construct waarop zich een gen bevindt dat stabiel tot expressie moet worden gebracht, waarbij een stabiele expressie-bevorderende DNA-volgorde geselecteerd met behulp van

de werkwijze volgens de uitvinding op minder dan 2000 bp van het gen wordt ingebracht.

Aldus kan een gen meer stabiel en voorspelbaar tot expressie worden gebracht.

5 Bij voorkeur wordt de stabiele expressie-bevorderende DNA-volgorde zowel bovenstrooms als benedenstrooms van het gen ingebracht.

Gemeend wordt dat hierdoor de kans verder wordt vergroot dat het gen stabiel tot expressie kan worden gebracht.

10 Tenslotte heeft de uitvinding betrekking op een toepassing van het DNA-construct volgens de uitvinding, waarbij het DNA-construct een vector is, voor het transformeren van een organisme, waarvoor geschikt een zoals hiervoor gedefinieerd organisme wordt genomen.

15 De onderhavige uitvinding zal thans nader worden toegelicht aan de hand van de volgende uitvoeringsvoorbeelden.

Voorbeeld I

Om het werkingsprincipe van de werkwijze volgens de
20 uitvinding aan te tonen, is gebruik gemaakt van scs, een DNA fragment uit *Drosophila melanogaster* waarvan bekend is dat het een boundary element is. Zoals uit het onderstaande voorbeeld blijkt, kan scs worden gebruikt voor het blokkeren van de volgende repressoren: HP1, Polycombgroep eiwitten en
25 MeCP2. Als negatieve controle zijn op dezelfde wijze DNA fragmenten van faag lambda getest. Scs (special chromatin structure) is oorspronkelijk geïsoleerd als een DNA sequentie die de heat shock gen locus (*hsp70*) in *Drosophila* flankiert (Kellum, R., and P. Schedl. 1991. Cell 64: 941-950). Zij hebben
30 gevonden dat indien scs rond een reporter gen wordt geplaatst en wordt teruggebracht in *Drosophila*, de expressie van een reporter gen minder variabel is. Zij hebben nog beschreven noch gesuggereerd dat scs kan worden gebruikt voor het tegengaan van repressie door andere repressoren, in het
35 bijzonder de hierboven genoemde repressoren. Ook hebben Kellum et al niet beschreven noch gesuggereerd dat scs in andere systemen dan *Drosophila* zou kunnen worden gebruikt voor het minder variabel maken van transgen expressie.

Voor het testen van de repressie-opheffende eigenschap van een DNA volgorde worden twee typen vectoren gemaakt.

Het eerste type vector bevat in 5'-3' volgorde: vier
5 LexA bindingsplaatsen, de te testen scs volgorde, de humane heat shock factor-induceerbare promoter en als reporter gen het luciferase gen. Ter controle is eenzelfde vector gemaakt welke in plaats van de bekende scs volgorde een willekeurig fragment (van faag lambda) van vergelijkbare lengte bevat
10 (beide beschreven in punt 1 hieronder).

Het tweede type vector bevat een gen dat codeert voor een fusie-eiwit tussen LexA en bovengenoemde repressoren, voor het in de getransformeerde cel bewerkstelligen van repressie van het reporter gen. Een vector van dit tweede type
15 bevat alleen het gen dat codeert voor LexA, een vector bevat het gen dat codeert voor LexA-HP1 etc (beschreven in punt 2 hieronder).

1 Een vector die codeert voor EBNA-1 (een nucleair
20 antigeen) is de hygromycine resistentie gen bevattende pREP4 vector (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA). De EBNA-1 sequentie is aanwezig om ervoor te zorgen dat de vector niet (stabiel) in het genoom integreert, maar episomaal repliceert. De
25 promotor (Prsv) van deze vector is verwijderd door digestie met het restrictie-enzym SalI en vervangen door een gesynthetiseerde sequentie met vier bindingsplaatsen voor LexA uit E. coli. Deze sequentie is van 5'-3': GTCGACTGCTGTATATAAAACCAGTGGTTATATGTA-
30 CAGTACTT GTACTGTACATATAACCACTGGTTTTATATACAG-CAAGCTTGGATCCGTCGAC. De 5' kant van deze sequentie bevat een SalI site, de 3' kant een HindIII-BamHI-SalI site (alle vet weergegeven). Benedenstrooms van de LexA bindingsites in the HindIII en BamHI sites
35 is in een drie-weg ligatie de humane heat shock factor-induceerbare promoter (0.29 kbp HindIII/NcoI fragment) en het luciferase reporter gen inclusief SV40 polyadenyleringssignaal (1.9 kbp NcoI/BamHI fragment) gekloneerd. De humane heat-shock factor

induceerbare promoter (hsp70; accession nummers M59828 en M34267; nucleotide 52 tot 244) is te verkrijgen door middel van PCR amplificatie op humaan genomische DNA (Cat. no 6550-1; Clontech, Palo Alto, USA). Als PCR primers kan worden gedacht aan forward primer 5'-3': AAGCTTGGGAGTCGAAACTTCTGGAAT-ATTCCCGAACTTTCAGCCGACGACTTATAAAACGCCAGGGGCAAGC; en als reverse primer 5'-3' aan:

CCATGGTTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAA-

AATCTCGCCAAGCTCCCGGGGTCCGCGAGAAGAGCTCGGTCCTTCCGG. De forward primer bevat een HindIII site, de reverse primer bevat een NcoI site (vet weergegeven). Het luciferase reporter gen inclusief SV40 polyadenyleeringsignalen werd verkregen via NcoI/BamHI digestie van de pGL3 control vector (Cat. no E1741; Promega, Madison, USA). In de aldus verkregen vector wordt in de HindIII site tussen de LexA bindingsplaatsen en de heat shock promoter hetzij een 2.1 kbp HindIII fragment van faag Lambda gekloneerd (Pharmacia Biotech, Uppsala, Zweden), hetzij een 1.7 kbp scs HindIII fragment. Het 1.7 kbp grote scs DNA fragment is geïsoleerd uit genomisch Drosophila DNA (Cat.#6940-1, Clontech, Palo Alto, USA) met behulp van PCR primers (Forward primer 5'-3': GATCAAGCTTATGATCTGCGTATGATACCAAATTTCTG; Reverse primer 5'-3': GACAAGCTTACATTGCTGGGCGAGCTGCGCCAATCG). Aan de uiteinden van deze primers zaten HindIII restrictie enzym sites. De vector met het Lambda fragment (controle) wordt aangeduid als reporter construct a, de vector met het scs fragment als reporter construct b. Restrictie enzym digesties, PCR amplificaties en cloneringen zijn uitgevoerd via standaardprocedures zoals beschreven in Sambrook et al., Molecular Cloning; a laboratory manual, second edition.

In de HindIII site van de neomycine resistentie gen bevattende pREP9 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) vector is het DNA bindende domein van het LexA eiwit (aa 1-202) (Cat.#6183-1, Clontech, Palo Alto,

USA) gecloneerd. Benedenstrooms en in frame met het LexA gen wordt per vector één gen gecloneerd dat codeert voor een repressor. De gebruikte repressoren zijn: het 1674 bp lange coderende gedeelte van het humane Polycomb groep gen HPC2 (Accession number Genbank: AAB80718), het 1131 bp lange coderende gedeelte van het humane Polycomb groep gen RING1 (Accession number Genbank: Z14000), het 4098 bp lange coderende gedeelte van het Drosophila Polycomb groep gen Su(z)2 (Accession number Genbank: CAA41965), (het 558 bp coderde gedeelte van M31 (*mHP1*) (Accession number Genbank: P23197), of het 1478 bp coderende gedeelte van MeCP2 (Accession number Genbank: A41907). Deze constructen coderen voor LexA-HPC2, LexA-RING1, LexA-Su(z)2, LexA-mHP1 en LexA-MeCP2 fusie-eiwitten ofwel LexA repressoren. Deze binden aan de LexA bindingsplaatsen (zie punt 1).

3 De reporter vectoren a en b en de LexA-repressor coderende vectoren worden tot expressie gebracht in humane U-2 OS (osteosarcoma) cellen die betrokken zijn van het ATTC (aanwinstnummer HTB-96). Transfectie van de cellen met de DNA constructen wordt uitgevoerd met behulp van de calciumfosfaat methode volgens voorschrift van de fabrikant van de transfectiekit (Cat No. 18306-019, Gibco BRL, Gaithersburg, USA). De osteosarcoma cellen groeien in aanwezigheid van 100 µg/ml neomycine (G418: cat. no. 1464981; Boehringer/Roche, Zwitserland) en 50 µg/ml hygromicineB (cat. no 843555; Boehringer/Roche, Zwitserland). Drie dagen na transfectie wordt een heat shock gegeven (43°C gedurende 1 uur, gevolgd door een 6 uur herstelperiode bij 37°C). Door deze behandeling wordt het luciferase gen geactiveerd en het luciferase reporter eiwit wordt geproduceerd. De enzymatische activiteit van dit luciferase eiwit is een maat voor de geïnduceerde inductie van transcriptie. Cellen worden opgewerkt en de luciferase enzymactiviteit wordt gemeten geheel volgens voor-

schrift van de fabrikant van de standaard gebruikte luciferase reporter gene assay kit (cat. no. 1814036; Boehringer/Roche, Zwitserland).

5 Resultaat

- 4 In cellen waarin het reporter construct a (met het Lambda fragment) tot expressie wordt gebracht maar geen LexA repressoren, komt de expressie van het luciferase gen tot expressie na heat shock. Dit is de 100% waarde.
- 10 5 In cellen waarin het reporter construct b (met het scs fragment) tot expressie wordt gebracht, maar geen LexA repressoren, komt de expressie van het luciferase gen na heat shock tot een waarde van 100%. Aangezien deze waarde niet boven de 100% uitkomt, is er dus, zoals eerder uitgelegd, geen sprake van een expressie-verhogende volgorde.
- 15 6 In cellen waarin het reporter construct a (met het Lambda fragment) tot expressie wordt gebracht, en tevens LexA repressoren tot expressie worden gebracht, wordt de expressie van het luciferase gen na heat shock onderdrukt tot gemiddeld 20%.
- 20 7 In cellen waarin het reporter construct b (met scs fragment) tot expressie wordt gebracht, en tevens LexA repressoren, komt de expressie van het luciferase gen na heat shock tot een waarde van 100%. Hieruit blijkt dat het induceren van de repressor-activiteit kan worden onderdrukt met scs.
- 25

30 Voorbeeld II

In plaats van luciferase als reporter gen kan volgens de onderhavige uitvinding ook een ander reporter gen worden gebruikt. Ook kunnen andere promoters worden gebruikt.

- 8 In de reporter constructen a en b is het luciferase reporter gen vervangen door het Zeocine resistentie gen. De heat shock promotor is vervangen door de constitutieve SV40 promotor (pSV40/ ZEO; cat. no. V502-20; Invitrogen, Carlsbad, USA). Na transfectie groeien de U-2 OS cellen in 250 µg/ ml Zeocine (cat.
- 35

no. R250-01: Invitrogen, Carlsbad, USA) en 100 μ g/ml neomycine (G418: cat. no. 1464981; Boehringer/Roche, Zwitserland).

- 9 Cellen die zijn getransfecteerd met het selectiecon-
5 struct dat een 2.1 kbp Lambda fragment bevat en te-
vens met een construct dat een LexA repressor tot
expressie brengt, gaan na 20-30 dagen dood. Hieruit
blijkt dat dit Lambda fragment niet in staat is de
10 repressie van het gen waarmee antibioticum-resisten-
tie wordt bereikt op te heffen.
- 10 Cellen die getransfecteerd zijn met het selectiecon-
struct dat het scs fragment bevat en tevens met een
construct dat een LexA repressor tot expressie
15 brengt, gaan niet dood maar blijven groeien. Ook dit
laat zien dat met het boundary element scs de re-
pressie van kan worden tegengegaan en dat de werk-
wijze volgens de onderhavige uitvinding met uiteen-
lopende promotors en reportergenen kan worden toege-
past.

20

Voorbeeld III

De met de werkwijze volgens de uitvinding gevonden
en geselecteerde volgorden kunnen worden gebruikt om repres-
sie in een ander organisme dan dat waaruit de volgorde afkom-
25 stig is tegen te gaan.

- 11 Er zijn twee nieuwe constructen, c en d gemaakt,
zogenaamde T-DNA constructen die geschikt zijn om
planten te transformeren
- 12 Construct c omvat een cassette met het NPTII (neomy-
30 cin phosphotransferase II) gen voor resistentie se-
lectie met kanamycine en het GUS (β -glucuronidase)
reporter gen. Het NPTII gene wordt gereguleerd door
de constitutieve nos promoter en het GUS reportergen
door de constitutieve CaMV 35S promoter (Mlynarova,
35 L. et al., 1995. The Plant Cell 7: 599-609).
- 13 Construct d is construct c waarin een scs fragment
is gecloneerd onmiddellijk bovenstrooms van de GUS-
CaMV/nos-NPTII cassette en een scs fragment onmid-
dellijk benedenstrooms van de cassette.

- 14 Agrobacterium tumefaciens is getransformeerd met
construct c of d. Arabidopsis planten zijn gedompeld
in een suspensie (kweek) van Agrobacterium tumefa-
ciens met construct c en in een suspensie van Agrob-
acterium tumefaciens met construct d (Clough et al.,
5 1998. The Plant J. 16: 735-743)
- 15 40 onafhankelijke Arabidopsis planten met construct
c of d zijn opgegroeid en het zaad van de planten is
verzameld. Het zaad is gezaaid op medium dat kanamy-
cine (cat. no. 106801; Boehringer/Roche, Swiss) be-
vat en GUS reporter activiteit is gemeten in de bla-
deren van de resulterende planten.
- 10 16 de GUS activiteit in planten met construct c is zeer
variabel (7 hoog; 6 intermediate; 11 laag; 16 nul);
- 15 15 de GUS activiteit in planten met construct d is sys-
tematisch hoger en de variabiliteit is afgenomen (26
hoog; 4 intermediate; 5 laag; 5 nul)
- 17 17 Hieruit blijkt dat met een boundary element een gen
meer stabiel tot expressie kan worden gebracht, ook
20 20 als dat boundary element niet uit hetzelfde organis-
me afkomstig is.

CONCLUSIES

1. Werkwijze voor het detecteren en optioneel selecteren van een DNA-volgorde, met het kenmerk, dat de te detecteren DNA-volgorde een stabiele expressie-bevorderende eigenschap heeft, welke werkwijze de stappen omvat van

- 5 1) het in een vector cloneren van DNA-fragmenten met een grootte <5000 baseparen tussen i) een DNA-volgorde welke betrokken is bij de inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chromatine, en ii) een reporter-gen dat een promotor omvat, onder oplevering van een verscheidenheid
10 van een fragment bevattende vectoren waarbij de afstand tussen de DNA-volgorde welke betrokken is bij de inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chromatine en het reporter-gen minder dan 5000 baseparen is;
- 15 2) het in gastheercellen brengen van de vectoren, in welke gastheercellen de promotor actief kan zijn doch inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chromatine in de vectoren tot onderdrukking van de transcriptie van het reporter-gen leidt; en
- 20 3) het aan een selectie onderwerpen van de gastheercellen om een gastheercel die activiteit van het reporter-gen vertoont te identificeren.

2. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het selecteren in stap 3) geschiedt onder gebruikmaking van een reporter-gen dat resistentie verschaft tegen een
25 groeiremmend agens en de gastheercellen worden gekweekt in aanwezigheid van het groeiremmende agens.

3. Werkwijze volgens conclusie 2, met het kenmerk, dat het groeiremmende agens aanwezig is in een concentratie die zo hoog is dat gastheercellen waarin het gen dat resis-
30 tentie verschaft tegen het groeiremmende agens niet actief is worden gedood.

4. Werkwijze volgens conclusie 2 of 3, met het ken-
merk, dat als het groeiremmende agens een antibioticum wordt toegepast en het reporter-gen een resistentie tegen het anti-
35 bioticum verlenend gen is.

5. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het reporter-gen codeert voor *Green Fluorescent Protein*.

6. Werkwijze volgens conclusie 5, met het kenmerk, dat fluorescente gastheercellen van niet-fluorescente gast-
5 heercellen worden gescheiden met behulp van een *Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS)*.

7. Werkwijze volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het reporter-gen luciferase is.

8. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies,
10 met het kenmerk, dat in stap 1) de fragmenten in hoofdzaak een grootte hebben tussen 2000-3000 baseparen.

9. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat de DNA-volgorde die betrokken is bij de inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chroma-
15 tine, een DNA-volgorde is die door een heterochromatine-bindend eiwit complex dat HP1 omvat wordt herkend en het HP1-omvattende complex in de gastheercel tot expressie wordt gebracht.

10. Werkwijze volgens één van de conclusies 1 tot 8,
20 met het kenmerk, dat de DNA-volgorde die betrokken is bij de inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chroma-
tine, een DNA-volgorde is die door een complex dat een Polycombgroep (PcG) eiwit omvat wordt herkend, en het Polycomb
groepeiwit-omvattende complex in de gastheercel tot expressie
25 wordt gebracht.

11. Werkwijze volgens één van de conclusies 1 tot 8, met het kenmerk, dat de DNA-volgorde die betrokken is bij de inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chroma-
tine, een DNA-volgorde is die door een complex dat een his-
30 ton-deacetylase-activiteit bezit wordt herkend, en het histon-deacetylase-activiteit bezittende complex in de gastheercel tot expressie wordt gebracht.

12. Werkwijze volgens één van de conclusies 1 tot 8, met het kenmerk, dat de DNA-volgorde die betrokken is bij de
35 inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chroma-
tine, een DNA-volgorde die door een eiwitcomplex dat MeCP2 (methyl-CpG-bindend eiwit 2) omvat wordt herkend, en wordt het MeCP2-omvattende complex in de gastheercel tot expressie gebracht.

13. Werkwijze volgens één van de conclusies 1 tot 12, met het kenmerk, dat de DNA-volgorde die betrokken is bij de inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chromatine, een DNA-volgorde is die selectief door ten minste één DNA-bindend eiwit wordt herkend en het organisme tevens een eiwitcomplex tot expressie brengt dat i) een de DNA-volgorde selectief-bindend eerste deel; en ii) een de vorming van chromatine waarin de transcriptie wordt onderdrukt inducerend tweede deel omvat.
14. Werkwijze volgens conclusie 13, met het kenmerk, dat het eiwitcomplex een fusie-eiwit omvat.
15. Werkwijze volgens conclusie 14, met het kenmerk, dat het eerste deel een de DNA-bindingsplaats van LexA- of GAL4-DNA-bindend deel is.
16. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat het organisme in stap 1) is gekozen uit de groep bestaande uit een plant en een gewerveld dier.
17. Werkwijze volgens conclusie 16, met het kenmerk, dat het gewervelde dier een zoogdier is.
18. Werkwijze volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat de vector een episomaal replicerende vector is.
19. Werkwijze volgens conclusie 18, met het kenmerk, dat de vector een replicatie oorsprong van het Epstein-Barr Virus (EBV), OriP, en een nucleair antigeen (EBNA-1) omvat.
20. DNA-volgorde gekozen uit i) een DNA-volgorde geïsoleerd uit een plant of gewerveld dier; of afgeleiden daarvan, en ii) een synthetische of door middel van genetische manipulatie geconstrueerde DNA-volgorde, welke DNA-volgorde een repressie-remmende volgorde is welke met de werkwijze volgens één van de conclusies 1 - 19 kan worden gedetecteerd, geselecteerd en optioneel gecloneerd.
21. DNA-volgorde gekozen uit i) een DNA-volgorde geïsoleerd uit een plant of gewerveld dier; of afgeleiden daarvan, en ii) een synthetische of door middel van genetische manipulatie geconstrueerde DNA-volgorde, welke DNA-volgorde met de werkwijze volgens één van de conclusies 1 - 19 is gedetecteerd, geselecteerd en optioneel gecloneerd.

22. Werkwijze voor het maken van een DNA-construct waarop zich een gen bevindt dat stabiel tot expressie moet worden gebracht, waarbij een stabiele expressie-bevorderende DNA-volgorde volgens conclusie 20 of 21 op minder dan 2000 bp
5 van het gen wordt ingebracht.

23. Werkwijze volgens conclusie 22, met het kenmerk, dat de stabiele expressie-bevorderende DNA-volgorde zowel bovenstrooms als benedenstrooms van het gen wordt ingebracht.

24. Toepassing van het DNA-construct verkregen volgens conclusie 22 of 22, waarbij het DNA-construct een vector
10 is, voor het transformeren van een organisme.

UITTREKSEL

De uitvinding heeft betrekking op een werkwijze voor het detecteren van een DNA-volgorde die er ten minste deels toe bijdraagt dat het stabiel tot expressie komen van gen wordt bevorderd. Daartoe wordt een te onderzoeken DNA-fragment in een vector gekloneerd tussen i) een DNA-volgorde die betrokken is bij de inductie van de transcriptie van genen onderdrukkend chromatine, en ii) een reporter-gen.

De uitvinding heeft tevens betrekking op een met de uitvinding te detecteren DNA-volgorde en het toepassen van een stabiele expressie-bevorderende DNA-volgorde voor het stabiel tot expressie brengen van een gen.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference WO 800110-AI	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/NL99/00518	International filing date (day/month/year) 16/08/1999	Priority date (day/month/year) 14/08/1998
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12Q1/68		
Applicant STICHTING VOOR DE TECHNISCHE WETENSCHAPPEN et al.		



1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 7 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☐ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☒ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 06/03/2000	Date of completion of this report 28.09.2000
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer Hoesel, H Telephone No. +49 89 2399 8693 

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/NL99/00518

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(substitute sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

Description, pages:

1-12 as originally filed

Claims, No.:

1-24 as originally filed

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
☐ the claims, Nos.:
☐ the drawings, sheets:

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

4. Additional observations, if necessary:

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	1 - 19
	No:	Claims	20 - 24
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	1 - 19
	No:	Claims	20 - 24
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1 - 24
	No:	Claims	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/NL99/00518

2. Citations and explanations

see separate sheet

VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Reference is made to the following document:

D1: Kellum & Schedl, Cell vol. 64, 1991, p. 941 - 50 (cited in the description, p. 6, lines 15 - 33)

SECTION V:

1. The method for the identification of DNA sequences involved in derepression as defined in claim 1 is neither disclosed nor suggested by the prior art referred to in the international search report.

The method of claims 1 - 19 therefore appears to meet the requirements of Art. 33(2) and (3) PCT.

2. Apart from being obscure and indefinite (see Section VIII), claims 20 and 21 lack novelty, contrary to Art. 33(2) EPC:

As set out in the description, nucleic acid sequences which are involved in derepression and therefore provide a stable expression of genes even in the presence of transcription inhibitors, particularly those named scs and scs', have been identified in *Drosophila* (D1). Constructs with insect genes have been made and investigated for their expression stability.

Contrary to the applicant's arguments, claims 20 and 21 are not limited to plant and vertebrate DNA sequences. According to definition (i), the claims extend to DNA sequences "*isolated from a plant or vertebrate or derivatives thereof*". The latter leaves the skilled in doubt as to the nature and degree of modifications and, thus, renders the scope of the said claims obscure. Consequently, isolated, insect derived scs domains are no longer excluded.

Moreover, the said claims include according to the alternative definition to (ii) "*a synthetic DNA sequence or one constructed by means of genetic engineering...*". The vectors disclosed in D1, figures 1 and 2 fall within the scope of this definition.

It is noted that in the experimental part construct comprising *Drosophila* scs

fragments only have been used. Plant or vertebrate homologues of *Drosophila* scs domains have not been identified.

Attention is drawn to the fact that (i) genes which encode ligands binding to enhancer or promoter elements and thus counteract silencers or (ii) genes which encode metabolite-dependent redressors (which are released from their DNA binding sites dependent on the presence or absence of the corresponding metabolite) as well as (iii) cis-active regulatory DNA elements, such as enhancers, fall within the broad scope of claims 20 and 21.

3. D1 also discloses the construction of vectors comprising *Drosophila* gene sequences operably linked with scs and scs', which vector promotes stable expression of the reporter gene "white"; thereby the document also anticipates the method according to claims 22 and 23.

It is evident from the conclusions drawn in this document, that the result of stable expression, independent of position effects could be transferred to monogenies comprising reporter genes different from "White" sequences.

Thus, even if limited, the method of claims 22 and 23 would lack inventive step (Art 33(3) PCT).

The objection analogously applies to the generically worded use according to claim 24.

SECTION VIII:

4. The application contains a variety of deficiencies that mark the application as a translation.

Some of the expressions deviate from the common terminology and lead to a lack of clarity of the claims (Art. 6 PCT).

(I) Having regard to example 1, the definition "DNA sequence involved in the induction of gene-transcription repressing chromatin" (Claim 1) appears to be

understood to mean "repressor binding site".

(ii) the wording "(DNA sequence possessing) a stable expression-enhancing quality" (also claim 1), should apparently read "DNA sequence providing for stable, repressor-independent transcription".

Having regard to the experimental part, the constructs containing the desired "antirepressors", provide for normal or only slightly reduced transcription even in the presence of a repressor molecule interacting with the binding site on the expression cassette rather than for quantitatively enhanced transcription rates compared to non-repressed controls.

Thus, the present wording seems to be misleading.

5. The application is entirely concerned with a screening method for suitable to identify particular, repression-inhibiting DNA sequences, and vectors suitable for this screening method.

Claim 24 does, however, not specify this particular use, it merely concerns the use of the claimed vectors for transformation of microorganisms.

Thus, the use as defined in claim 24 is not supported by the description as required by Article 6 PCT, as its scope is broader than justified by the description and drawings. Attention is drawn to the fact that the claim, as it presently stands, does not reflect the essential technical features of the method of claim 1 and thus could be considered to lack unity with respect to the subject-matter of claim 1 (Rule 13 PCT).

6. In claims 20 and 21, the DNA sequences are defined in terms of their function and behaviour in a particular screening system only.

The definition does not permit a correlation with particular structural elements, e.g. in terms of defined sequence of motifs. Thus, the scope of claims 20 and 21 is obscure (Art. 6 PCT) and cannot be clearly limited with respect to regulatory active sequences already described in the prior art (e.g. D1, see Section V).

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT - SEPARATE SHEET**

International application No. PCT/NL99/00518

7. Having regard to the actual content, the application is limited to *Drosophila scs* and *scs'* elements. Functional homologues of these regulatory domains, be it of plants or vertebrates have not been identified or characterized.

Claims 20 and 21 thus lack support, contrary to Art. 6 PCT insofar as plant or vertebrate homologues of *Drosophila scs'* elements are concerned.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

**NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE**

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

ALTENBURG, Bernardus, Stephanus,
Franciscus
Octrooibureau Los En Stigter B.V.
Weteringschans 96
NL-1017 XS Amsterdam
PAYS-BAS

Date of mailing (day/month/year) 31 May 2000 (31.05.00)	
Applicant's or agent's file reference WO 800110-AI	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/NL99/00518	International filing date (day/month/year) 16 August 1999 (16.08.99)

1. The following indications appeared on record concerning: <input checked="" type="checkbox"/> the applicant <input type="checkbox"/> the inventor <input type="checkbox"/> the agent <input type="checkbox"/> the common representative		
Name and Address STICHTING VOOR DE TECHNISCHE WETENSCHAPPEN Raadstede 15/19 NL-3431 HA Nieuwegein Netherlands	State of Nationality NL	State of Residence NL
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning: <input type="checkbox"/> the person <input type="checkbox"/> the name <input checked="" type="checkbox"/> the address <input type="checkbox"/> the nationality <input type="checkbox"/> the residence		
Name and Address STICHTING VOOR DE TECHNISCHE WETENSCHAPPEN Van Vollenhovenlaan 661 NL-3527 JP Utrecht Netherlands	State of Nationality NL	State of Residence NL
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	
3. Further observations, if necessary:		
4. A copy of this notification has been sent to: <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> the receiving Office <input type="checkbox"/> the International Searching Authority <input checked="" type="checkbox"/> the International Preliminary Examining Authority </div> <div> <input type="checkbox"/> the designated Offices concerned <input checked="" type="checkbox"/> the elected Offices concerned <input type="checkbox"/> other: </div> </div>		

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer S. De Michiel Telephone No.: (41-22) 338.83.38
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
 United States Patent and Trademark
 Office
 Box PCT
 Washington, D.C. 20231
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 01 May 2000 (01.05.00)	
International application No. PCT/NL99/00518	Applicant's or agent's file reference WO 800110-AI
International filing date (day/month/year) 16 August 1999 (16.08.99)	Priority date (day/month/year) 14 August 1998 (14.08.98)
Applicant OTTE, Arie, Pieter	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

06 March 2000 (06.03.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:
2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer C. Villet
Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Telephone No.: (41-22) 338.83.38

2000

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

ALTENBURG, Bernardus, Stephanus,
Franciscus
Octrooibureau Los En Stigter B.V.
Weteringschans 96
NL-1017 XS Amsterdam
PAYS-BAS

**NOTIFICATION OF THE RECORDING
OF A CHANGE**

(PCT Rule 92bis.1 and
Administrative Instructions, Section 422)

Date of mailing (day/month/year) 31 May 2000 (31.05.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference WO 800110-AI	
International application No. PCT/NL99/00518	International filing date (day/month/year) 16 August 1999 (16.08.99)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address STICHTING VOOR DE TECHNISCHE WETENSCHAPPEN Raadstede 15/19 NL-3431 HA Nieuwegein Netherlands	State of Nationality NL	State of Residence NL
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address STICHTING VOOR DE TECHNISCHE WETENSCHAPPEN Van Vollenhovenlaan 661 NL-3527 JP Utrecht Netherlands	State of Nationality NL	State of Residence NL
	Telephone No.	
	Facsimile No.	
	Teleprinter No.	

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned
☒ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer S. De Michiel Telephone No.: (41-22) 338.83.38
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 11207 A (VILLEPONTEAU BRYANT ; HARLEY CALVIN (US); GERON CORP (US)) 19 March 1998 (1998-03-19)	1-19
X	the whole document	20-24
X	WO 97 10337 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE) 20 March 1997 (1997-03-20)	20-24
X	US 5 721 096 A (KARATHANASIS SOTIRIOS K ET AL) 24 February 1998 (1998-02-24)	20-24
X	WO 94 29468 A (THROMBOSIS RES INST ; BLEASDALE CIAO CHANG (GB); DEMOLIOU MASON CAT) 22 December 1994 (1994-12-22)	20-24

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 November 1999

Date of mailing of the international search report

30/11/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Molina Galan, E

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9811207	A	19-03-1998	US 5972605 A AU 4351997 A	26-10-1999 02-04-1998
WO 9710337	A	20-03-1997	AU 7103896 A EP 0871729 A	01-04-1997 21-10-1998
US 5721096	A	24-02-1998	NONE	
WO 9429468	A	22-12-1994	AU 6855094 A	03-01-1995

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AL	Albania	ES	Spain	LS	Lesotho	SI	Slovenia
AM	Armenia	FI	Finland	LT	Lithuania	SK	Slovakia
AT	Austria	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Senegal
AU	Australia	GA	Gabon	LV	Latvia	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaijan	GB	United Kingdom	MC	Monaco	TD	Chad
BA	Bosnia and Herzegovina	GE	Georgia	MD	Republic of Moldova	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tajikistan
BE	Belgium	GN	Guinea	MK	The former Yugoslav Republic of Macedonia	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Greece			TR	Turkey
BG	Bulgaria	HU	Hungary	ML	Mali	TT	Trinidad and Tobago
BJ	Benin	IE	Ireland	MN	Mongolia	UA	Ukraine
BR	Brazil	IL	Israel	MR	Mauritania	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Iceland	MW	Malawi	US	United States of America
CA	Canada	IT	Italy	MX	Mexico	UZ	Uzbekistan
CF	Central African Republic	JP	Japan	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Netherlands	YU	Yugoslavia
CH	Switzerland	KG	Kyrgyzstan	NO	Norway	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Democratic People's Republic of Korea	NZ	New Zealand		
CM	Cameroon			PL	Poland		
CN	China	KR	Republic of Korea	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstan	RO	Romania		
CZ	Czech Republic	LC	Saint Lucia	RU	Russian Federation		
DE	Germany	LJ	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Denmark	LK	Sri Lanka	SE	Sweden		
EE	Estonia	LR	Liberia	SG	Singapore		

Method of detecting a DNA sequence, a DNA sequence, a method of making a DNA construct and the use thereof

The present invention relates to a method of detecting, and optionally selecting, a DNA sequence.

It is not easy to detect a specific DNA sequence of which the nucleotide sequence is not known. Despite the fact that genetic manipulation has been employed for decades, predictably bringing to expression a gene in a genetically modified plant, animal or other eukaryotic organism is a problem. Although many microbiological methods of production merely aim at the highest possible expression, in plants or animals the exact level of a gen's expression is for many applications of great importance. Too much expression as well as too little expression may lead to the desired result not being achieved. Also, experience has shown that after sexual reproduction the ability for expression in a subsequent generation is often lost again. It is also difficult to control the moment in time and the location of expression in the organism (tissue specificity).

It is the object of the invention to provide a method of the kind mentioned in the preamble, which makes it possible to select and, if desired, isolate a DNA sequence, whereby the above-mentioned problems can be avoided.

To this end the method according to the preamble is characterized in that the DNA sequence to be detected possesses a stable expression-enhancing quality, which method comprises the steps of

- 1) the cloning in a vector of DNA fragments having a size of <5000 base pairs between i) a DNA sequence involved in the induction of gene transcription-repressing chromatin, and ii) a reporter gene comprising a promoter, resulting in a variety of a fragment-comprising vectors, wherein the distance between the DNA sequence involved in the induction of the transcription of

gene-repressing chromatin and the reporter gene is fewer than 5000 base pairs;

- 2) introducing the vectors into host cells, in which host cells the promotor may be active but induction of the transcription of gene-repressing chromatin in the vectors results in the repression of the transcription of the reporter gene; and
- 3) subjecting the host cells to a selection in order to identify a host cell exhibiting reporter gene-activity.

This provides a reliable method of detecting DNA sequences having a stable expression-enhancing quality. If desired, this sequence may be isolated and inserted before another gene. As the DNA in step 1, for example, a restriction enzyme-cleaved DNA from a eukaryotic organism, in particular a plant or a vertebrate, is used wherein the size of the DNA fragments is below 5000 base pairs.

Clearly, when the occasion arises it will be possible to readily distinguish between on the one hand an expression-enhancing sequence ("enhancer"), which in extreme cases would be able to neutralize the transcription-repressing effect of chromatin, and on the other hand the stable expression-enhancing DNA fragment. In the first case the reporter gene in an organism is transformed with a vector comprising the promotor together with the reporter gene but without the transcription-repressing sequence is expressed at a higher level than in an organism transformed with a vector comprising a stable expression-enhancing DNA fragment together with the reporter gene and likewise, without the transcription-repressing sequence.

According to a first preferred embodiment, the selection in step 3) occurs by using a reporter gene which provides resistance to a growth inhibitor and the host cells are cultivated in the presence of the growth inhibitor.

This inhibits the growth of host cells which, without an active resistance gene, are not resistant to the growth inhibitor, and allows the selection of those host

cells which possess a stable expression-enhancing DNA sequence.

Preferably, the growth inhibitor is present in a concentration sufficiently high to kill host cells in which the gene providing resistance to the growth inhibitor is not active.

This ensures to a large extent that growing organisms will comprise a vector with the desired DNA sequence.

Very conveniently an antibiotic is used as the growth inhibitor and the reporter gene is a gene providing resistance to the antibiotic.

A great assortment of genes providing resistance to antibiotics is available in the field, making it simple to choose a gene suitable for the host cell. A gene is then chosen which provides resistance to a growth inhibitor to which the host cell is not already resistant of itself.

In accordance with a second embodiment the reporter gene codes for Green Fluorescent Protein.

By means of fluorescence measurement it is then possible to detect and isolate host cells with the desired DNA-comprising vector.

According to a preferred embodiment, fluorescent host cells are separated from non-fluorescent host cells by means of a Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS).

According to a third embodiment the reporter gene is luciferase. With the aid of luciferase it is possible to perform (semi)-quantitative measurement of the expression.

In step 1) it is preferred that the fragments have a size of substantially between 2000 - 3000 base pairs.

Fragments of such a size allow a more precise localization of the sequence to be detected without the number of host cells to be screened in step 3) becoming so large that this is going to form an unnecessary work load.

Conveniently, the DNA sequence involved with the transcription induction of gene-repressing chromatin is a DNA sequence that is recognized by a heterochromatin-binding protein comprising HP1 (heterochromatin-binding protein 1), which HP1-comprising complex is expressed in the

host cell. According to an alternative method, the DNA sequence is recognized by a complex comprising a Polycomb-group (Pc-G) protein, and the Polycomb-group protein-comprising complex is expressed in the host cell. According to yet another embodiment, the DNA sequence is recognized by a complex possessing a histone deacetylase activity, and the histone deacetylase activity-possessing complex is expressed in the host cell. Finally, according to a further embodiment, the DNA sequence involved in the induction of the transcription of gene-repressing chromatin is a DNA sequence recognized by a protein complex comprising MeCP2 (methyl-CpG-binding protein 2), and the MeCP2-comprising complex is expressed in the host cell.

In this manner four suitable complexes recognizing DNA sequences are provided, while it should be noted that in the event of the complex not being expressed in the host cell, this will not result in false positives and will merely limit the efficiency with which the wanted DNA sequences are detected.

Conveniently, the protein complex comprises a fusion protein, such as a protein complex wherein the first part is a part binding the DNA-binding site of LexA-DNA or GAL4-DNA.

Suitable DNA binding sites of this kind are known in the art and are obtained from bacteria or yeast.

The organism in step 1) is preferably chosen from the group comprising a plant and a vertebrate such as, more particularly, a mammal.

For these organisms applies that, partly due to the large amount of chromosomal DNA, it is practically impossible without the method of the present invention to find the DNA sequence to be detected, since indeed its base sequence is unknown.

According to a further preferred embodiment, the vector is an episomally replicating vector, such as suitably a vector comprising a replication origin from the Epstein-Barr virus (EBV), OriP, and a nuclear antigen (EBNA1).

Such vectors are easy to handle, can be genetically manipulated and are vectors which form a chromatin structure in which the expression is repressed.

The invention further relates to a DNA sequence
5 selected from i) a DNA sequence isolated from a plant or vertebrate, or derivatives thereof, and ii) a synthetic DNA sequence or one constructed by means of genetic engineering, which DNA sequence is a repression-inhibiting sequence which, by the method according to the present
10 invention can be detected, selected and optionally cloned.

More specifically, the invention further relates to a DNA sequence selected from i) a DNA sequence isolated from a plant or vertebrate, or derivatives thereof, and ii) a synthetic DNA sequence or one constructed by means
15 of genetic engineering, which DNA sequence is detected, selected and optionally cloned by the method according to the present invention.

The DNA sequences according to the invention differ from the known DNA sequences in that they are not an
20 enhancer or silencer.

Synthetic DNA sequences may be prepared in accordance with techniques generally known in the art. In particular, it is possible to prepare large numbers of different DNA sequences, and such sequences are commercially
25 available (for example from: Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). However, such synthetic DNA sequences have to be suitable for cloning in a plasmid. This is generally known in the art and is done, for example, with linkers comprising a restriction cleavage site.

30 Clearly, the present invention also relates to a method of making a DNA construct comprising a gene that is to be expressed stably, wherein a stable expression-enhancing DNA sequence, selected with the aid of the method according to the invention is inserted at less than
35 2000 bp from the gene.

This is a more stable and predictable manner of expressing a gene.

Preferably the stable expression-enhancing DNA sequence will be inserted both upstream and downstream from the gene.

It is believed that this further increases the
5 likelihood of a stable gene expression.

Finally, the invention relates to a use of the DNA construct according to the invention, wherein the DNA construct is a vector, for the transformation of an organism which suitably is an organism as defined above.

10 The present invention will now be further elucidated with reference to the following exemplary embodiments.

Example I

15 To illustrate the principle of the workings of the method according to the invention, scs is used, which is a DNA fragment from *Drosophila melanogaster* which is known to be a boundary element. As can be seen from the example below, scs can be used for blocking the following repressors: HP1, Polycomb-group proteins and MeCP2. In the same
20 manner, DNA fragments from phage lambda have been tested as negative control. Scs (special chromatin structure) was originally isolated as a DNA sequence flanking the heat shock locus (*hsp70*) in *Drosophila* (Kellum, R. and P. Schedl. 1991. Cell 64: 941-950). They have found that when
25 scs is placed around a reporter gene and is reintroduced in *Drosophila*, the expression of a reporter gene is less variable. They neither reported nor suggested that scs may be used to prevent repression by other repressors, in particular the above-mentioned repressors. Also, Kellum et
30 al. neither reported nor suggested that scs might be used in systems other than *Drosophila* for rendering transgene expression less variable.

For testing the repression-eliminating property of
35 a DNA sequence, two types of vectors are constructed.

The first type of vector comprises in 5'-3' sequence: four LexA binding sites, the scs sequence to be tested, the human heat shock factor-inducible promotor, and the luciferase gene as reporter gene. As a control a

similar vector is made which instead of the known scs sequence comprises a random fragment (from phage lambda) of a comparable length (both described in point 1 below).

To accomplish repression of the reporter gene in the transformed cell, the second type of vector comprises a gene coding for a fusion protein of LexA and the above-mentioned repressors. A vector of this second type comprises the gene coding for LexA only, or a vector comprises the gene coding for LexA-HP1, etc. (described in point 2 below).

1 A vector coding for EBNA-1 (a nuclear antigen) is the hygromycin resistance gene comprising pREP4 vector (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA). De EBNA-1 sequence is present to ensure that the vector does not (stably) integrate in the genome, but replicates episomally. The promotor (Prsv) of this vector has been removed by digestion with the restriction enzyme SalI and replaced by a synthesized sequence having four binding sites for LexA from *E. coli*. This sequence is from 5'-3':
20 **GTGCTGCTGTATATAAAACAGTGGTTATATGTACAGTACTT**
GTACTGTACATATAACCACTGGTTTTATATACAG-
CAAGCTTGGATCCGTCGAC. The 5' side of this sequence comprises a SalI site, the 3' side a HindIII-BamHI-SalI site (all shown in bold type). Downstream from the LexA binding sites in the HindIII and BamHI sites, the human heat shock factor-inducible promotor (0.29 kbp HindIII/NcoI fragment) and the luciferase reporter gene inclusive of SV40 polyadenylation signal (1.9 kbp NcoI/BamHI fragment) are cloned in a three-way ligation. The human heat shock factor-inducible promotor (hsp70; accession numbers M59828 and M34267; nucleotides 52 to 244) can be obtained by means of PCR amplification on human genomic DNA (Cat. No. 6550-1; Clontech, Palo Alto, USA). As PCR primers, forward primer 5'-3':
35 **AAGCTTGGGAGTCGAACTTCTGGAATATTTCCCGAACTTTCAGCCGACGACTTATAAAACGCCAGGGGCAAGC** may be considered; and as reverse primer 5'-3': **CCATGGTTTAGCTTCCTTAGCTCCTGAA-**

AATCTCGCCAAGCTCCCGGGGTCCGCGAGAAGAGCTCGGTCCTTCCGG.

The forward primer comprises a HindIII site, the reverse primer comprises a NcoI site (given in bold print). The luciferase reporter gene inclusive of SV40 polyadenylation signals were obtained through NcoI/BamHI digestion of the pGL3 control vector (Cat. no E1741; Promega, Madison, USA). In the thus obtained vector, in the HindIII site between the LexA binding sites and the heat shock promotor, either a 2.1 kbp HindIII fragment of phage lambda is cloned (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden), or a 1.7 kbp scs HindIII fragment. The 1.7 kbp scs DNA fragment is isolated from genomic *Drosophila* DNA (Cat.#6940-1, Clontech, Palo Alto, USA) with the aid of PCR primers (Forward primer 5'-3': GATCAAGC-TTATGATCTGCGTATGATACCAAATTTCTG; Reverse primer 5'-3': GACAAGCTTACATTGCTGGGCGAGCTGCGCCAATCG). At the ends of these primers HindIII restriction enzyme sites were located. The vector with the Lambda fragment (control) is indicated as reporter construct a, the vector with the scs fragment as reporter construct b. Restriction enzyme digestions, PCR amplifications and clonings are performed by standard procedures as described in Sambrook et al., Molecular Cloning; a laboratory manual, second edition.

2 The DNA-binding domain of the LexA protein (aa 1-202) (Cat.#6183-1, Clontech, Palo Alto, USA) is cloned in the HindIII site of the neomycin resistance gene-comprising pREP9 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, USA) vector. Downstream and in frame with the LexA gene, one gene coding for a repressor is cloned per vector. The repressors used are: the 1674 bp-long coding part of the humane Polycomb-group gene HPC2 (accession number Genbank: AAB80718), the 1131 bp-long coding part of the humane Polycomb-group gene RING1 (accession number Genbank: Z14000), the 4098 bp-long coding part of

the *Drosophila* Polycomb-group gene Su(z)2 (accession number Genbank: CAA41965), the 558 bp coding part of M31 (mHP1) (accession number Genbank: P23197), or the 1478 bp coding part of MeCP2 (accession number Genbank: A41907). These constructs code for LexA-HPC2, LexA-RING1, LexA-Su(z)2, LexA-mHP1 and LexA-MeCP2 fusion proteins, or LexA repressors. These bind to the LexA binding sites (see point 1).

- 3 The reporter vectors a and b and the LexA repressor-coding vectors are expressed in humane U-2 OS (osteosarcoma) cells obtained from the ATTC (accession number HTB-96). Transfection of the cells with the DNA constructs is performed using the calcium phosphate method in accordance with the instructions of the manufacturer of the transfection kit (Cat. No. 18306-019, Gibco BRL, Gaithersburg, USA). The osteosarcoma cells grow in the presence of 100 µg/ml neomycin (G418: Cat. No. 1464981; Boehringer/Roche, Switzerland) and 50 µg/ml hygromycin B (Cat. No 843555; Boehringer/Roche, Switzerland). Three days after transfection a heat shock is given (43°C for 1 hour, followed by a 6-hour recovery period at 37°C). This treatment activates the luciferase gene and causes the production of the luciferase reporter protein. The enzymatic activity of this luciferase protein is a measure of the transcription induction that has been induced. Cells are purified and the luciferase enzyme activity is measured, all in compliance with the manufacturer's instructions for the standard luciferase reporter gene assay kit (Cat. No. 1814036; Boehringer/Roche, Switzerland).

Result

- 4 In cells in which the reporter construct a (with the Lambda fragment) is expressed, but no LexA

repressors, the luciferase gene is expressed after heat shock. This is the 100% value.

- 5 In cells in which the reporter construct b (with the scs fragment) is expressed, but no LexA repressors, the luciferase gene is expressed after heat shock up to a value of 100%. Since this value does not exceed the 100% it shows, as explained earlier, that it is not an expression-increasing sequence.
- 10 6 In cells in which the reporter construct a (with the Lambda fragment) is expressed, and also LexA repressors are expressed, the expression of the luciferase gene after heat shock is repressed to an average of 20%.
- 15 7 In cells in which the reporter construct b (with scs fragment) is expressed, and at the same time LexA repressors, the expression of the luciferase gene after heat shock reaches a value of 100%. This shows that the induction of the repressor activity can be repressed with scs.
- 20

Example II

Instead of luciferase as reporter gene, it is according to the present invention also possible to use another reporter gene. It is also possible to use other promoters.

25

- 8 In the reporter constructs a and b the luciferase reporter gene has been replaced by the Zeocin resistance gene. The heat shock promotor has been replaced by the constitutive SV40 promotor (pSV40/ZEO; Cat. No. V502-20; Invitrogen, Carlsbad, USA). After transfection the U-2 OS cells grow in 250 µg/ml Zeocin (Cat. No. R250-01; Invitrogen, Carlsbad, USA) and 100 µg/ml neomycin (G418; Cat. No. 1464981; Boehringer/Roche, Switzerland).
- 30
- 35 9 Cells that have been transfected with the selection construct comprising a 2.1 kbp Lambda fragment and also with a construct that expresses a LexA repressor, die after 20-30 days. This shows that

the Lambda fragment is not able to overcome the repression of the gene with which antibiotics resistance is achieved.

5 10 Cells that are transfected with the selection construct comprising the scs fragment and also with a construct that expresses a LexA repressor, do not die but continue to grow. This also shows that with the boundary element scs the repression can be overcome and that the method according to the present invention can be employed using a variety of
10 promoters and reporter genes.

Example III

The sequences found and selected by the method
15 according to the invention can be used to combat repression in an organism other than that from which the sequence is derived.

11 Two new constructs, c and d, are made, so-called T-DNA constructs, which are suitable for the transformation of plants.
20

12 Construct c comprises a cassette with the NPTII (neomycin phosphotransferase II) gene for resistance selection with kanamycin and the GUS (β -glucuronidase) reporter gene. The NPTII gene is
25 regulated by the constitutive nos promotor and the GUS reporter gene by the constitutive CaMV 35S promotor (Mlynarova, L. et al., 1995. The Plant Cell 7: 599-609).

13 Construct d is construct c in which an scs fragment is cloned immediately upstream from the GUS-CaMV/nos-NPTII cassette and an scs fragment immediately downstream from the cassette.
30

14 Agrobacterium tumefaciens is transformed with construct c or d. *Arabidopsis* plants are submerged in a suspension (culture) of *Agrobacterium tumefaciens* with construct c and in a suspension of *Agrobacterium tumefaciens* with construct d (Clough et al.,
35 1998. The Plant J. 16: 735-743).

- 15 40 individual *Arabidopsis* plants with construct c
or d are raised and the seeds of the plants col-
lected. The seeds are sown onto a medium containing
kanamycin (Cat. No. 106801; Boehringer/Roche,
5 Swiss) and GUS reporter activity is measured in the
leaves of the developed plants.
- 16 The GUS activity in plants with construct c is very
variable (7 high; 6 intermediate; 11 low; 16 zero);
the GUS activity in plants with construct d is sys-
10 tematically higher and the variability is reduced
(26 high; 4 intermediate; 5 low; 5 zero).
- 17 This shows that a gene can be expressed more stably
with a boundary element, even if this boundary
element does not originate from the same organism.

CLAIMS

1. A method of detecting, and optionally selecting,
5 a DNA sequence, characterized in that the DNA sequence to be detected possesses a stable expression-enhancing quality, which method comprises the steps of

- 1) the cloning in a vector of DNA fragments having a size of <5000 base pairs between i) a DNA sequence involved
10 in the induction of gene-transcription repressing chromatin, and ii) a reporter gene comprising a promoter, resulting in a variety of a fragment-comprising vectors, wherein the distance between the DNA sequence involved in the induction of the transcription of gene-repressing chromatin and the reporter gene is
15 fewer than 5000 base pairs;
- 2) introducing the vectors into host cells, in which host cells the promoter may be active but induction of the transcription of gene-repressing chromatin in the
20 vectors results in the repression of the transcription of the reporter gene; and
- 3) subjecting the host cells to a selection in order to identify a host cell exhibiting reporter gene-activity.

25 2. A method according to claim 1, characterized in that the selection in step 3) occurs by using a reporter gene which provides resistance to a growth inhibitor and the host cells are cultivated in the presence of the growth inhibitor.

30 3. A method according to claim 2, characterized in that the growth inhibitor is present in a concentration sufficiently high to kill host cells in which the gene providing resistance to the growth inhibitor is not active.

35 4. A method according to claim 2 or 3, characterized in that an antibiotic is used as the growth inhibitor and the reporter gene is a gene providing resistance to the antibiotic.

5. A method according to claim 1, **characterized** in that the reporter gene codes for Green Fluorescent Protein.

6. A method according to claim 5, **characterized** in that fluorescent host cells are separated from non-fluorescent host cells by means of a Fluorescence-Activated Cell Sorter (FACS).

7. A method according to claim 1, **characterized** in that the reporter gene is luciferase.

8. A method according to any of the preceding claims, **characterized** in that the fragments have a size of substantially between 2000 - 3000 base pairs.

9. A method according to any of the preceding claims, **characterized** in that the DNA sequence involved with the transcription induction of gene-repressing chromatin is a DNA sequence that is recognized by a heterochromatin-binding protein comprising HP1 which HP1-comprising complex is expressed in the host cell.

10. A method according to any of the claims 1 to 8, **characterized** in that the DNA sequence involved with the transcription induction of gene-repressing chromatin is a DNA sequence that is recognized by a complex comprising a Polycomb-group (Pc-G) protein, and the Polycomb-group protein-comprising complex is expressed in the host cell.

11. A method according to any of the claims 1 to 8, **characterized** in that the DNA sequence involved with the transcription induction of gene-repressing chromatin is a DNA sequence that is recognized by a complex possessing a histone deacetylase activity, and the histone deacetylase activity-possessing complex is expressed in the host cell.

12. A method according to any of the claims 1 to 8, **characterized** in that the DNA sequence involved in the transcription induction of gene-repressing chromatin is a DNA sequence that is recognized by a protein complex comprising MeCP2 (methyl-CpG-binding protein 2), and the MeCP2-comprising complex is expressed in the host cell.

13. A method according to any of the preceding claims, **characterized** in that the DNA sequence involved with the transcription induction of gene-repressing

chromatin is a DNA sequence that is selectively recognized by at least one DNA-binding protein and the organism also expresses a protein complex comprising i) a first part selectively binding the DNA sequence, and ii) a second
5 part inducing the formation of chromatin in which the transcription is repressed.

14. A method according to claim 13, characterized in that the protein complex comprises a fusion protein.

15. A method according to claim 14, characterized
10 in that the first part is a part binding the DNA-binding site of LexA-DNA or GAL4-DNA.

16. A method according to any of the preceding claims, characterized in that the organism in step 1) is selected from the group comprising a plant and a verte-
15 brate.

17. A method according to claim 16, characterized in that the vertebrate is a mammal.

18. A method according to any of the preceding claims, characterized in that the vector is an episomally
20 replicating vector.

19. A method according to any of the preceding claims, characterized in that the vector comprises a replication origin from the Epstein-Barr virus (EBV), OriP, and a nuclear antigen (EBNA1).

20. A DNA sequence selected from i) a DNA sequence
25 isolated from a plant or vertebrate, or derivatives thereof, and ii) a synthetic DNA sequence or one constructed by means of genetic engineering, which DNA sequence is a repression-inhibiting sequence which, by the method according to the present invention can be detected, selected
30 and optionally cloned.

21. A DNA sequence selected from i) a DNA sequence isolated from a plant or vertebrate, or derivatives thereof, and ii) a synthetic DNA sequence or one constructed by
35 means of genetic engineering, which DNA sequence is detected, selected and optionally cloned by means of the method according to any of the claims 1 to 19.

22. A method of making a DNA construct comprising a gene that is to be expressed stably, wherein a stable

expression-promoting DNA sequence is integrated in accordance with claim 20 or 21 in fewer than 2000 bp of the gene.

23. A method according to claim 22, characterized
5 in that the stable expression-enhancing DNA sequence will be integrated both upstream and downstream from the gene.

24. A use of the DNA construct obtained in accordance with claim 22 or 23, wherein the DNA construct is a vector for the transformation of an organism.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

National Application No

PCT/NL 99/00518

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 11207 A (VILLEPONTEAU BRYANT ; HARLEY CALVIN (US); GERON CORP (US)) 19 March 1998 (1998-03-19) the whole document	1-19
X	the whole document	20-24
X	WO 97 10337 A (BAYLOR COLLEGE MEDICINE) 20 March 1997 (1997-03-20) the whole document	20-24
X	US 5 721 096 A (KARATHANASIS SOTIRIOS K ET AL) 24 February 1998 (1998-02-24) the whole document	20-24
X	WO 94 29468 A (THROMBOSIS RES INST ; BLEASDALE CIAO CHANG (GB); DEMOLIOU MASON CAT) 22 December 1994 (1994-12-22) the whole document	20-24

☐ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"8" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 November 1999

Date of mailing of the international search report

30/11/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Molina Galan, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

ation on patent family members

ional Application No

PCT/NL 99/00518

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9811207	A	19-03-1998	US	5972605 A	26-10-1999
			AU	4351997 A	02-04-1998
WO 9710337	A	20-03-1997	AU	7103896 A	01-04-1997
			EP	0871729 A	21-10-1998
US 5721096	A	24-02-1998	NONE		
WO 9429468	A	22-12-1994	AU	6855094 A	03-01-1995